

# HPLC-MS 法分离与表征微囊藻毒素<sup>\*</sup>

陈永芳<sup>1</sup> 刘思全<sup>2</sup> 王立国<sup>1</sup> 贾瑞宝<sup>3</sup>

(1. 济南大学资源与环境学院,济南 250022; 2. 济南大学化学化工学院,济南 250022; 3. 济南市供排水监测中心,济南 250021)

**摘要** 蓝藻水华对淡水湖泊的污染近年来逐渐加剧,其释放的主要有害物质为微囊藻毒素。藻毒素异构体的分离与制备研究对供水安全具有重要的意义。从滇池蓝藻中提取了微囊藻毒素的几种常见异构体并采用高效液相色谱手段对各异构体进行了分离。探讨了不同色谱条件对分离结果的影响,其中的 5 种异构体得到了很好地分离,使用 HPLC-MS 对 3 种含量较多的异构体进行了表征。

**关键词** 微囊藻毒素 分离 表征 高效液相色谱 高效液相色谱-质谱联用技术

近年来,随着我国水体的富营养化程度逐渐加剧,蓝藻水华和赤潮的发生逐渐增加。80% 的蓝藻水华都可以检测出次生代谢产物——微囊藻毒素(microcystins, MCs),它对水体环境和人群健康的危害已成为全球关注的重大环境问题之一<sup>[1]</sup>。

微囊藻毒素为七肽单环肝毒素<sup>[2]</sup>,结构中存在着环状结构和间隔双键,因而具有相当的稳定性。它能够强烈抑制蛋白磷酸酶的活性<sup>[3]</sup>,当细胞破裂或衰老时毒素释放进入水中<sup>[4,5]</sup>,同时它还是强烈的肝脏肿瘤促进剂<sup>[6]</sup>。因此微囊藻毒素异构体的分离与表征对于分析蓝藻水华对水体污染的影响具有重要的作用。

笔者以甲醇-水为提取溶剂对蓝藻进行粗提,利用固相萃取手段对微囊藻毒素粗品进行初步纯化与除杂后用高效液相色谱成功分离了微囊藻毒素异构体。使用 HPLC-MS 对微囊藻毒素的主要 3 种异构体进行了表征。

## 1 实验部分

### 1.1 主要仪器与试剂

高效液相色谱仪:Agilent 1100 型,美国安捷伦科技有限公司;

HPLC-MS 联用仪:美国热电公司;

离心机:TGL-16C 型,上海安亭科学仪器厂;

C<sub>18</sub> 固相萃取小柱:容量 6 mL,填充 500 mg,天津博纳艾杰尔科技有限公司;

甲醇:色谱纯,山东禹王实业有限公司化工分公司,使用时与水配制成不同的比例;

乙腈:分析纯,上海化学试剂研究所,使用时与水配制成不同的比例;

三氟乙酸:化学纯,上海化学试剂公司;

微囊藻毒素标准品-LR:美国 sigma 公司;

微囊藻毒素标准品-RR:美国 sigma 公司;

亚沸蒸馏水:用 SYZ-550 型石英亚沸高纯水蒸馏器制备。

### 1.2 实验方法

(1) 粗提:首先将从云南滇池得到的蓝藻离心,然后按一定的比例加入 20%~65% 的甲醇水溶液,室温下磁力搅拌,超声震荡,以 10 000 r/min 的转速离心,取出上清液;残渣重复萃取两次,合并上清液;将提取液过 0.45 μm 的微滤膜,除去大分子杂质,得微囊藻毒素粗品。

(2) 纯化与富集:将粗品通过 ODS C<sub>18</sub> 反相萃取柱,依次用 10 mL 100% 甲醇、10 mL 超纯水活化萃取柱,再将粗提液以 1 mL/min 的流速流经固相萃取柱进行富集浓缩,而后用一定浓度的甲醇淋洗。收集洗脱液,于 30℃ 条件下浓缩至 1 mL。

(3) 分离:采用高效液相色谱法。色谱条件:Kromasil C<sub>18</sub> 色谱柱(250 mm × 4.6 mm, 5 μm, 12 nm);流动相:甲醇-水溶液、乙腈-水溶液(三氟乙酸缓冲溶液);柱温:室温;检测波长 238 nm;流速:0.5 mL/min;进样量:2~10 μL;保留时间定性。

(4) 表征:高效液相色谱-质谱联用法(HPLC-MS)。质谱条件:喷雾电压:4.5 kV;聚焦电压:220 kV;入口电压:12 V;离子源温度:215℃;锥孔电压:30 V;扫描范围:*m/z* 75~1 300。

## 2 结果与讨论

### 2.1 萃取与预纯化

(1) 萃取:文献[7]报道了在蓝藻中提取微囊藻毒素的方法,主要是用 50%~90% 的甲醇溶液进行萃取,通过实验探讨,发现 65% 的甲醇溶液提

\* 国家水体污染控制与治理科技重大专项(2008ZX07422-003);济南大学自然科学基金项目(XKY0906);济南大学博士基金项目(XBS1010)

收稿日期:2010-12-22

取效果最好,可最大程度提取出蓝藻细胞内外的微囊藻毒素。

(2) 预纯化:将微囊藻毒素粗品通过 $0.45\text{ }\mu\text{m}$ 的微滤膜,除去大分子物质以及纤维等杂质,然后采用反相C<sub>18</sub>固相萃取柱进一步除杂与初步纯化。通过探讨发现,甲醇浓度越大,除杂效果越好,但当增大到一定浓度时,微囊藻毒素也会相应越多的洗脱出来,因此采用40%甲醇淋洗,70%甲醇洗脱可达到较好的效果。

## 2.2 高效液相色谱分离

文献[8-11]报道对微囊藻毒素异构体的分离主要采取反相高效液相色谱法,不同流动相对藻毒素的分离效果影响较大。笔者主要探讨了不同比例的甲醇-水体系、乙腈-水体系和乙腈-水-0.01%三氟乙酸体系对微囊藻毒素异构体的分离效果。

实验结果表明:不同比例的甲醇-水体系对分离结果的影响,发现80%的甲醇-水作为流动相时,分离结果较好,但微囊藻毒素的各异构体仍然不能完全分开,这与文献报道有明显的区别;乙腈-水体系表现出与甲醇-水类似的规律,提高流动相中有机溶剂比例,微囊藻毒素出峰较早,尤其对于早出峰的MC-YR分析干扰较大,而体积分数降低时,MC-LR出峰则较迟且峰形较差,通过对比发现采用80%的乙腈作为流动相,分离效果较好;而在乙腈-水体系中加入0.01%三氟乙酸时,并没出现如文献报道的更好分离效果。

将滇池蓝藻提取物色谱图与标准物质在同样色谱条件下得到的色谱图对照,比较各异构体的保留时间,初步判定滇池蓝藻中含有微囊藻毒素的3种主要异构体,即MC-YR 3.335 min, MC-RR 4.679 min和MC-LR 7.37 min。

## 2.3 高效液相色谱-质谱表征

对所得的微囊藻毒素异构体进行HPLC-MS表征,其总离子流图及保留时间为4.85 min的组分质谱图见图1。

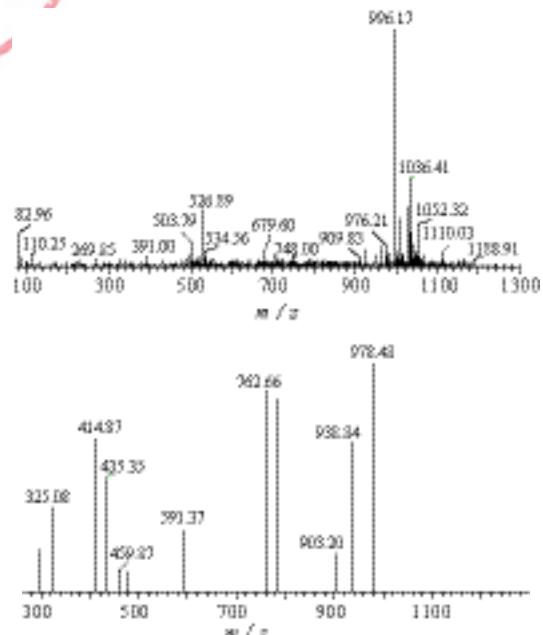
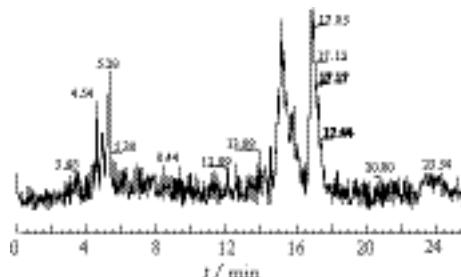


图1 微囊藻毒素异构体 HPLC-MS 图

由图1可以看出,保留时间为4.85 min的组分一级质谱图 $m/z$  996.17为 $[\text{M} + \text{H}]^+$ 母离子峰,而MC-LR的分子量为995.17,其它碎片峰也与文献报道的MC-LR碎片峰相符。

同样,在总离子流图中保留时间为4.54 min和5.28 min对应的离子峰分别为 $m/z$  1039.2和1046.18为 $[\text{M} + \text{H}]^+$ 母离子峰,判断出为微囊藻毒素异构体MC-YR和MC-RR。

## 3 结论

考查了微囊藻毒素异构体提取与纯化的条件,以及高相液相色谱中流动相种类和比例对藻毒素异构体分离结果的影响,结果表明:65%甲醇溶液提取效果较好,采用80%乙腈-水体系作为流动相得到了较好的分离效果。采用HPLC-MS对微囊藻毒素主要3种异构体进行表征。目前,HPLC方法虽然是制备微囊藻毒素纯品的最实用方法,但仍存在制备量较小、制备成本较高的问题。随着微囊藻毒素需求量的增加,对微囊藻毒素的提取与纯化方法需进行进一步的研究,以寻求更高效的制备、纯化技术来提取更大量的微囊藻毒素纯品。

## 参考文献

- [1] 盛建武,何苗,施汉昌,等.蓝藻毒素的监测及水华暴发的应急方案[J].中国给水排水,2005,21(5):26-28.
- [2] 李祝,卢蒙,朱迟,等.微囊藻毒素的提取与纯化研究进展[J].华中师范大学研究生学报,2004,11(2):115-119.
- [3] 林毅雄,刘秀芬.滇池铜绿微囊藻毒素及其在水体中的变化[J].环境污染治理技术与设备,2001,2(5):10-13.
- [4] 戴瑾瑾,陈德辉,高云芳,等.蓝藻毒素的研究概况[J].武汉植

- 物学研究,2009,27(1):90-97.
- [5] 张立将,尹立红,浦跃朴,等.水中微囊藻毒素高效液相色谱检测与前处理条件优化[J].东南大学学报,2005,35(3):446-451.
- [6] 熊宗华,汤晓智,刘萍,等.蓝藻中生物活性物质的研究概况[J].药物生物技术,2001,8(5):296-300.
- [7] Lawton L A, Edwards C. Purification of microcystins[J]. J of Chromatography,2001,912:191-209.
- [8] Ikawa M, Phillips N, Haney J F, et al. Interference by plastics additives in the HPLC determination of microcystin-LR and -YR[J]. Toxicology,1999,37(6):923-929.
- [9] 区晖,周志洪,吴清柱.高效液相色谱法测定地表水中微囊藻毒素-LR[J].广州环境科学,2009,24(1):25-26.
- [10] 陈晓国,杨力力,肖邦定,等.微囊藻毒素[Dha7]MCRR的制备及鉴定[J].环境科学,2007,18(9):2063-2067.
- [11] 赵永刚,胡冠九,章勇,等.固相萃取高效液相色谱法测定地表水中微囊藻毒素[J].理化检验:化学分册,2008,44(12):1176-1179.

## SEPARATION AND CHARACTERIZATION OF MICROCYSTINS-LR BY HPLC-MS

Chen Yongfang<sup>1</sup>, Liu Siquan<sup>2</sup>, Wang Liguo<sup>1</sup>, Jia Ruibao<sup>3</sup>

(1. School of Resources and Environment, University of Jinan, Jinan 250022, China;

2. School of Chemistry and Chemical Engineering, University of Jinan, Jinan 250022, China;

3. Jinan Water and Waste Water Monitoring Center, Jinan 250021, China)

**ABSTRACT** The pollution of freshwater lakes caused by algal blooms which can release the microcystins (MCs) became serious in recent years. The separation and characterization of MCs isomers are very important to the research of water supply security. MCs isomers were extracted from cyanobacteria of Dianchi Lake and separated by high performance liquid chromatography. Different ratio of extract solvent and chromatographic conditions were discussed. Five MCs isomers were successfully extracted. Three of which were characterized by HPLC-MS.

**KEYWORDS** microcystins, separation, characterization, HPLC, HPLC-MS

### 欢迎订阅 2011 年《计测技术》

《计测技术》创刊于 1958 年,是中航工业北京长城计量测试技术研究所(国防科技工业第一计量测试研究中心)主办的计量测试技术类期刊,双月刊,逢双月 28 日出版,国内外公开发行。

《计测技术》是中国核心期刊(遴选)数据库收录期刊,中国学术期刊综合评价数据库统计源期刊,中国期刊全文数据库、中文科技期刊数据库、台湾 CEPS 期刊数据库全文收录期刊。国际刊号:ISSN 1674-5795,国内刊号:CN 11-5347/TB。

本刊为国防科技工业系统、部队、民用计量测试部门、工厂、研究所、院校、相关设备制造商和各大公司服务。广泛刊载长、热、力、电、无线电、时间频率、光学、化学、放射性、声学等计量测试、动态校准与管理稿件。设有理论与实践,新技术新仪器,计量、测试与校准,计算机技术与应用,误差与不确定度,计测管理,综合评述,经验与体会等主要栏目。

欢迎订阅 2011 年度杂志,本刊邮发代号:80-441;全年定价:60 元。读者可到各地邮局订阅,也可直接与编辑部联系。

通讯地址:北京市海淀区 1066 信箱杂志社 邮政编码:100095

电话:010-62457159(编辑部),010-62457160(广告部),传真:010-62457159

E-mail: mmt304@126.com ;hkjc@chinajournal.net.cn

### 《计测技术》2011 年第 31 卷第 1 期目次

#### 理论与实践

基于 RBF 神经网络的微惯性测量组合标定双轨法 D-In-SAR 形变测量的误差分析

#### 新技术新仪器

渗透法标准湿度发生器中渗透管的研制  
数字图像处理技术在表面划痕测量中的应用  
基于 PC104 总线的 ARINC429 航空接口卡计  
电容式传声器自由场互易校准数据处理系统设计  
提高 F-P 腔精细度方法的研究  
单翼迷宫式滴灌带流量均匀度性能测试系统  
**计量、测试与校准**

移相干涉技术用于运动姿态精密测量  
某型教练机副翼拉杆应力水平测试分析

稳态数字散斑测量仪校准方法探讨

#### 计算机技术与应用

无线局域网测试系统研究

基于 ASP.NET 的计量器具管理系统的设计

#### 综合评述

CCD 多光谱辐射测温技术的应用与发展  
飞机机翼结冰计算方法与风洞试验研究概况  
误差和不确定度  
大电流充放电电源的电流不确定度评定  
经验与体会  
酸度计检定及维修探讨  
影响罗茨气体流量计计量准确性的原因分析